

На правах рукописи

Камышинский Роман Андреевич

**СТРУКТУРА БИОКРИСТАЛЛОВ DPS-ДНК ПО ДАННЫМ
КРИОЭЛЕКТРОННОЙ ТОМОГРАФИИ**

Специальность 01.04.18 –
«Кристаллография, физика кристаллов»

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Москва - 2020

Работа выполнена в лаборатории электронной микроскопии Института кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук».

Научный руководитель: **Васильев Александр Леонидович**, кандидат физико-математических наук, доцент, ведущий научный сотрудник ресурсного центра зондовой и электронной микроскопии НИЦ «Курчатовский институт», заведующий лабораторией электронной микроскопии Института кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН по совместительству.

Официальные оппоненты: **Боргардт Николай Иванович**, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой общей физики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники».

Киреев Игорь Игоревич, доктор биологических наук, заведующий отделом электронной микроскопии Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Защита состоится «___» _____ 2020 г. в ___ часов ___ минут на заседании диссертационного совета Д 002.114.01 при ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН по адресу 119333, г. Москва, Ленинский пр., 59, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке, а также на сайте ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН <https://www.kif.ras.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д002.114.01,
кандидат физ.-мат. наук

Фролов Кирилл Владимирович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Образование живыми организмами кристаллов органических макромолекул было открыто более века назад, но механизм ответа живой материи на экстремальные внешние условия по-прежнему остается малоизученным. В частности, остается открытым вопрос о структуре комплекса Dps-ДНК, образуемого в клетках *Escherichia coli* при переходе в стационарную фазу в качестве защитной реакции на воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды. Известно, что переход клеток в стационарную фазу сопровождается резким увеличением внутриклеточного синтеза гистоноподобного белка Dps (**D**N**A**-**b**inding **p**rotein from **s**tarved cells), который, формируя внутриклеточные кристаллы в комплексе с молекулами ДНК, обеспечивает эффективную защиту последних [1, 2]. Данный механизм позволяет обеспечить продолжительную сохранность генома при экстремальных температурах, голодании, обезвоживании, воздействии радиации и антибиотиков [3, 4].

Несмотря на то, что структура белка Dps [5] и условия образования комплекса Dps-ДНК достаточно хорошо изучены [6, 7], до недавнего времени не удавалось определить структуру нанокристаллов комплекса и напрямую визуализировать ДНК в нанокристаллах, ввиду чего утверждения о их конформации оставались гипотезами, а большинство предложенных на сегодняшний день моделей комплекса [2, 5, 8] носят умозрительный характер. Кроме того, неизвестен детальный механизм взаимодействия ДНК с Dps, лежащий в основе образования биокристаллов.

Криогенная просвечивающая электронная микроскопия (крио-ПЭМ, крио-ЭМ), получившая существенное развитие в последние годы и являющаяся основным структурным методом представленной работы, позволяет изучать сложные биологические макромолекулы с разнообразной морфологией, демонстрируя пространственное разрешение до 1.2 Å при использовании метода

анализа проекций одиночных частиц [9] и до 2-10 Å при применении криоэлектронной томографии (крио-ЭТ) [10]. Таким образом, исследования методами крио-ЭМ структуры биокристаллов позволяют получить новую информацию о структуре комплекса Dps-ДНК.

Целью данной работы является определение структуры биокристаллов комплекса Dps-ДНК, полученных *in vitro* и *in cellulo*, методами крио-ЭМ, в том числе получение трехмерных структур исследуемых кристаллов с помощью крио-ЭТ, а также анализ влияния концентрации и состава буфера образцов Dps и ДНК на структуру кристаллов *in vitro*.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

- Определить оптимальные условия для проведения процедуры витрификации исследуемых образцов.
- Подобрать соотношения и составы буферов образцов Dps и ДНК, при которых наблюдается формирование биокристаллов комплекса.
- Определить оптимальные параметры проведения крио-ПЭМ исследований и съёмки томографических серий изображений.
- Провести трехмерную реконструкцию полученных данных и субтомографическое усреднение для исследуемых кристаллов комплекса.
- Изучить внутриклеточные кристаллические образования в бактериальных клетках *Escherichia coli*.
- Определить сайты связывания белка Dps и ДНК при смешении образцов ДНК различной длины и Dps в различных буферах.

Научная новизна:

1. Впервые методом криоэлектронной томографии получена трехмерная реконструкция биокристаллов комплекса Dps-ДНК, полученных *in vitro*.
2. Впервые продемонстрирован полиморфизм кристаллов комплекса Dps-ДНК. Обнаружена зависимость структуры комплекса Dps-ДНК от условий его формирования.
3. Впервые продемонстрировано формирование биокристаллов комплекса Dps-ДНК с триклинной и кубической элементарными ячейками. Определены параметры элементарных ячеек.
4. Впервые определено положение молекул ДНК в структуре биокристаллов Dps-ДНК.
5. Впервые визуализировано пространственное положение биокристаллов в клетках *Escherichia coli*.
6. Впервые методом анализа проекций одиночных частиц визуализировано взаимодействие Dps-ДНК.
7. Впервые визуализированы N-концевые фрагменты додекамеров Dps на двумерных классах изображений.

Помимо фундаментального научного интереса и несомненной важности глубокого понимания основ функционирования отдельных элементов живой материи - белков и нуклеиновых кислот, в том числе при выполнении ими защитных функций, **практическая значимость** данной работы определяется широким потенциалом в разработке новых механизмов борьбы с бактериальной резистентностью к лекарственным препаратам. Известно, что резистентность клеток к воздействию антибактериальных средств в стационарной фазе многократно возрастает, что приводит к увеличению численности штаммов различных патогенных организмов, устойчивых к антибиотикам. Понимание и последующее преодоление бактериальной и вирусной резистентности является одной из важнейших проблем современной медицины. Данные о механизмах

формирования устойчивых форм бактерий позволят контролировать процессы перехода бактерий в анабиоз и выхода из него и вносить коррективы как в методы борьбы с инфекционными заболеваниями, так и в методы восстановления клеток из анабиоза. Полученные при выполнении данной работы результаты могут быть использованы для разработки новых антибактериальных препаратов. Кроме того, исследование механизма защиты генетического материала важно для различных применений в биотехнологии, так как потенциально может позволить стабилизировать используемые организмы и биологические продукты, повысив их устойчивость к внешним воздействиям.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Структура комплекса Dps-ДНК зависит от условий его формирования. Существует полиморфизм биокристаллов комплекса.
2. Происходит формирование биокристаллов комплекса Dps-ДНК двух различных типов:
 - Биокристаллы первого типа имеют триклинную элементарную ячейку (SG P1) с параметрами $a \approx b = 9.3 \pm 0.4$ нм, $c = 10.3 \pm 0.4$ нм, $\alpha = 73^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 60^\circ$.
 - Биокристаллы второго типа имеют кубическую элементарную ячейку ($Pm\bar{3}m$) с параметрами $a = b = c = 13 \pm 1$ нм, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.
3. В зависимости от типа кристаллов молекулы ДНК укладываются параллельно или перпендикулярно друг другу.
4. Взаимодействие додекамеров Dps в слоях обеспечивается N-концевыми фрагментами.

Достоверность и обоснованность полученных научных результатов определяется использованием высокоточной современной экспериментальной базы, применением комплементарных методов исследования, а также согласованностью и воспроизводимостью расчетных и экспериментальных данных. Данные крио-ЭМ, представленные в настоящей работе, подтверждены с

помощью исследований методом малоуглового рентгеновского рассеяния, проведенных для всех исследуемых образцов биокристаллов и клеток на синхротроне DESY, накопительном кольце Petra III линии P12, сотрудниками ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника» РАН Л.А. Дадиновой, М.П. Петуховым, А.А. Можяевым, Э.В. Штыковой и др.

Апробация работы проведена на научных конференциях, школах и семинарах различного уровня:

- 61-я Всероссийская научная конференция МФТИ (МФТИ, Москва, 2018);
- Russian international Conference on Cryo-Electron Microscopy (МГУ, Москва, 2019);
- XX Зимняя молодежная научная школа по биофизике и молекулярной биологии (НИЦ КИ – ПИЯФ, Гатчина, 2019);
- RSF - Helmholtz Meeting (Гамбург, Германия, 2019);
- XVI Курчатовская междисциплинарная молодежная научная школа (НИЦ КИ, Москва, 2019);
- The 44th FEBS Congress “From molecules to living systems” (Краков, Польша, 2019);
- XXI Зимняя молодежная научная школа по биофизике и молекулярной биологии (НИЦ КИ – ПИЯФ, Гатчина, 2020);
- XXVIII Российская конференция по электронной микроскопии (Черноголовка, 2020).

Части диссертационной работы были представлены на конкурсы научных работ, где были отмечены следующими наградами:

- Премия имени академика Н.В. Белова (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, молодежный конкурс, секция «Кристаллография», 2019);
- Премия имени И.В. Курчатова (НИЦ "Курчатовский институт", секция студенческих работ, 2018);

- Диплом 61-й Всероссийской научной конференции МФТИ (МФТИ ГУ, секция НБИК-технологий, 2018).

Результаты проведенных исследований использованы при выполнении проектов Российского Научного Фонда № 18-74-10071 «Структурные аспекты механизма протекции бактериального генома, как принципиальный шаг на пути преодоления резистентности бактерий к антибиотикам» и НИЦ «Курчатовский Институт» (приказ № 1360 от 25 июня 2019 года) «Разработка новых методических подходов криогенной растровой и просвечивающей электронной микроскопии в исследованиях клеточных систем *in vitro*».

Личный вклад. Результаты диссертационной работы получены автором лично или при его непосредственном участии. Автор принимал активное участие в планировании и проведении экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, подготовке публикаций в рецензируемых научных изданиях, а также лично представлял результаты работы в виде устных и стендовых докладов на ведущих международных и российских конференциях, школах и семинарах.

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 16 печатных изданиях: 7 – в журналах, рекомендованных ВАК, 9 – в тезисах докладов.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав и заключения. Полный объем диссертации составляет 136 страниц печатного текста, включая 57 рисунков и 2 таблицы. Список литературы содержит 178 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность исследования структуры биокристаллов Dps-ДНК; сформулированы поставленные цели работы и задачи, решаемые для их достижения; указаны научная новизна и практическая значимость; изложены основные положения, выносимые на защиту диссертации.

Первая глава посвящена обзору литературы по теме диссертационной работы. В **разделах 1.1 и 1.2** приводится обзор литературы по явлению внутриклеточной кристаллизации, в частности, образованию комплекса Dps-ДНК в бактериальных клетках *E.coli*. Рассматривается роль белка Dps, приведен обзор существующих моделей комплекса Dps-ДНК (рис. 1).

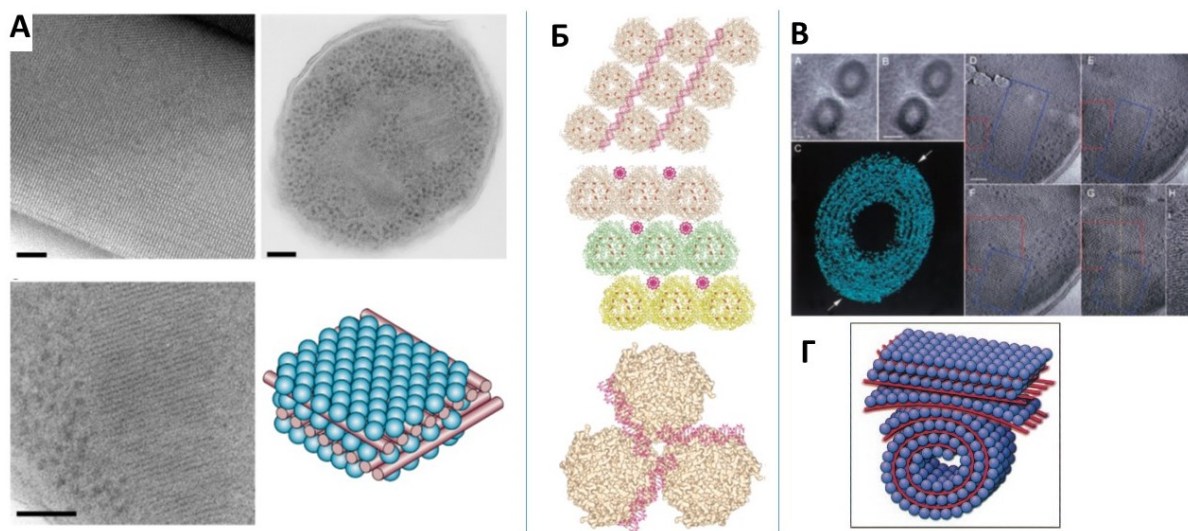


Рисунок 1. Основные модели комплекса Dps-ДНК. А – результаты *in vitro* и *in cellulo* исследований комплекса Dps-ДНК, а также модель комплекса, предложенная в работе [8]; Б – модель комплекса Dps-ДНК, предложенная в работе [5]. В – томографические срезы *E.coli* в после 24-часового голодания. Наблюдаются торoidalные структуры, предположительно соответствующие комплексу. Г - модель комплекса Dps-ДНК, предложенная в работе [2].

Раздел 1.3 посвящен обзору современных методов крио-ЭМ и их возрастающей роли в структурной биологии. Рассмотрены основные этапы

развития крио-ЭМ, обсуждаются основные возможности и ограничения метода. Представлен обзор методов пробоподготовки биологических образцов, в частности, обсуждается процедура витрификации и приготовление тонких клеточных срезов с помощью фокусированного ионного пучка в криогенном режиме (крио-ФИП). Детально освещены основные подходы современной крио-ЭМ – метод анализа проекций одиночных частиц и крио-ЭТ [А3], подробно рассмотрены способы получения и обработки экспериментальных данных.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования. В разделе **2.1** приводится описание изученных материалов - образцов Dps и ДНК, клеток *E.coli*. В разделе **2.2** подробно описаны методы получения и подготовки образцов для исследований, параметры витрификации и приготовления тонких клеточных срезов с помощью крио-ФИП. Детально представлены основные этапы получения (раздел **2.3**) и обработки (раздел **2.4**) экспериментальных данных методом крио-ЭТ, в том числе с применением субтомографического усреднения (рис. 2), а также методом анализа проекций одиночных частиц.

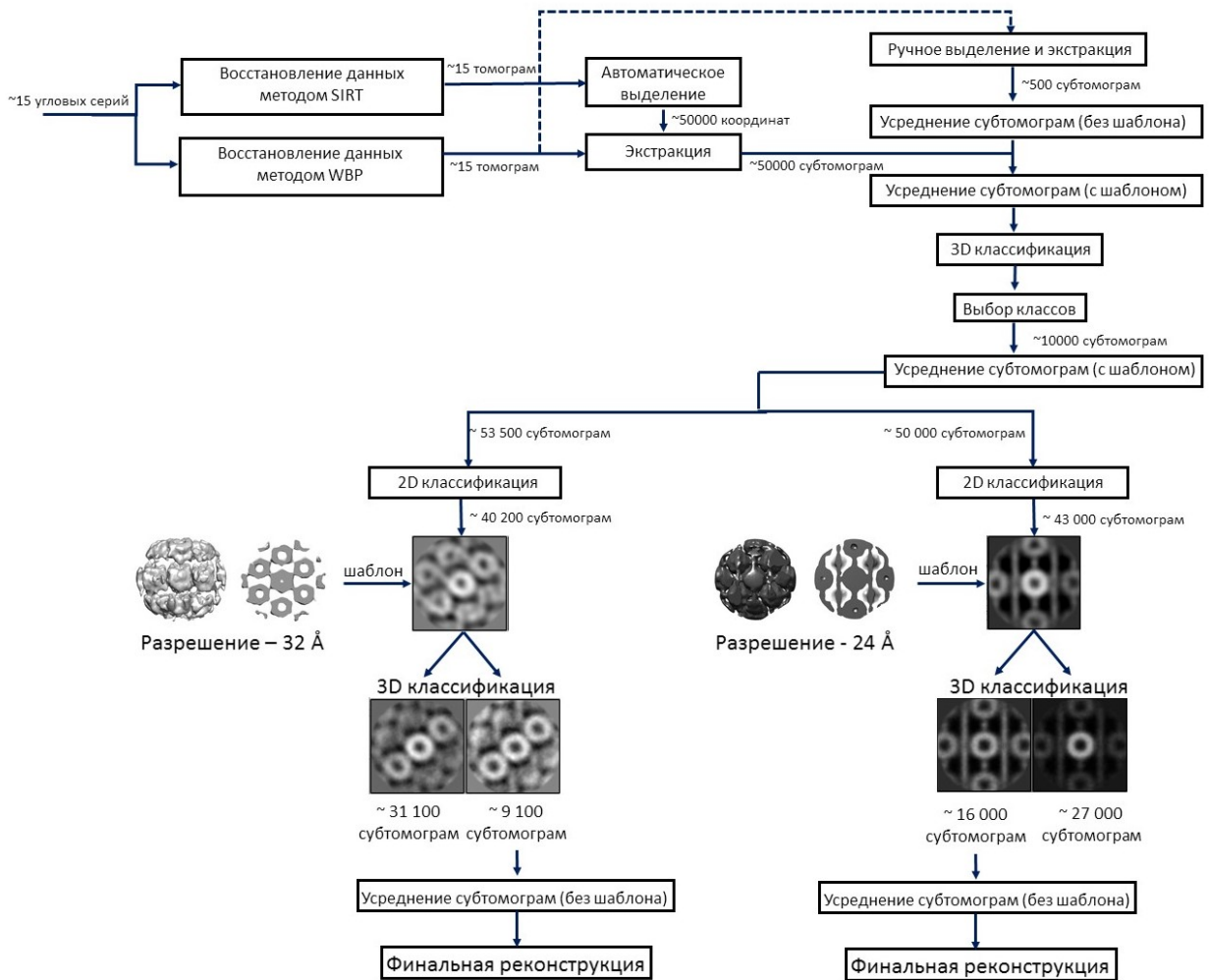


Рисунок 2. Схема обработки данных крио-ЭТ.

В третьей главе приводится описание отработки методов крио-ЭМ на различных образцах. Представлены описание и результаты отработки процедур витрификации, применения крио-ПЭМ, крио-ФИП, электронной томографии и крио-ЭТ. Отработанные методы всех этапов проведения экспериментов позволили исследовать биокристаллы Dps-ДНК *in vitro* и *in cellulo*. Результаты, представленные в Главе 3, опубликованы в работах [А4-А7].

В четвертой главе отражены основные результаты диссертационной работы. В разделе 4.1 представлены результаты *in cellulo* крио-ПЭМ исследований, проведенных на клетках *E. coli*, подвергнутых стрессовому воздействию, а также на контрольных образцах (рис. 3).

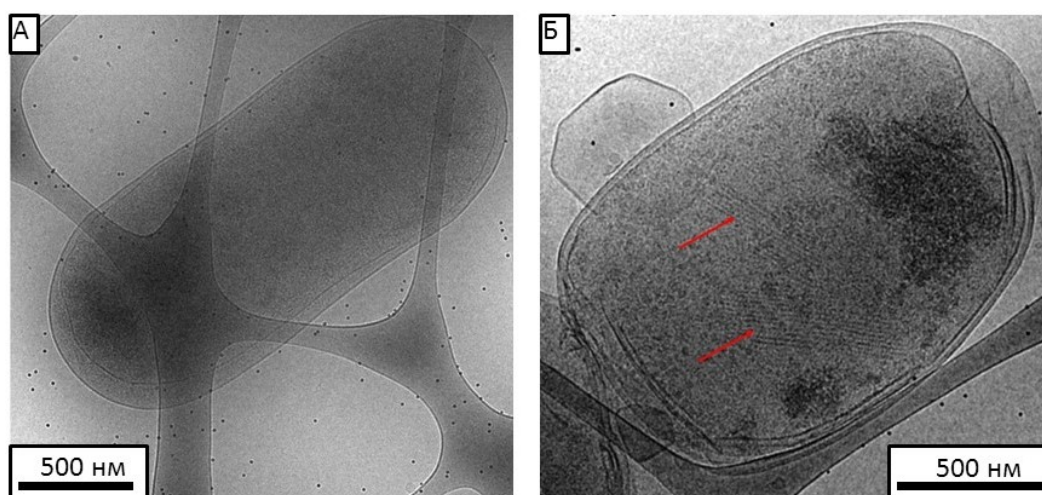


Рисунок 3. Крио-ПЭМ изображения клеток *E. coli*: А - не подверженной стрессовому воздействию; Б - подверженной стрессовому воздействию. Красными стрелками показаны наблюдаемые кристаллы.

Показано, что стрессовое воздействие приводит к формированию внутриклеточных кристаллов комплекса (рис. 3 Б). Получена трехмерная реконструкция низкого разрешения для клеток с кристаллами (рис. 4), определены межплоскостные расстояния кристаллов.

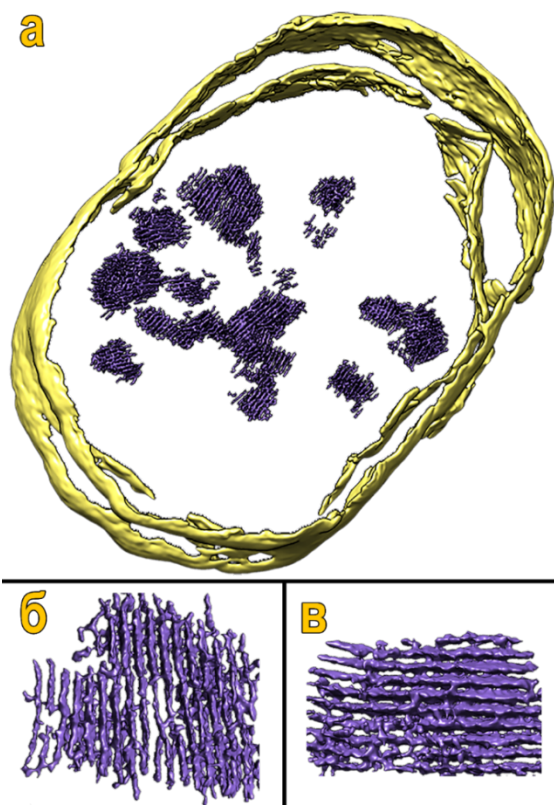


Рисунок 4. Трехмерная реконструкция бактериальной клетки и биокристаллов. Клеточная мембрана (а) показана желтым, биокристаллы (а - в) - фиолетовым.

В разделе 4.2 представлены результаты проведенного *in vitro* крио-ПЭМ исследования морфологии образцов Dps и Dps-ДНК. При исследовании раствора чистого белка Dps обнаружено образование псевдогексагональной упаковки додекамеров белковых макромолекул. При исследовании препарата, полученного путем смешения растворов Dps и ДНК в различных концентрациях, обнаружено образование биокристаллов со средним размером 40-300 нм.

В разделе 4.3 представлены результаты крио-ЭТ исследования кристаллов, полученных *in vitro*. **В разделе 4.3.1** продемонстрировано формирование кристаллов комплекса Dps-ДНК в буфере 50 мМ Tris-HCl, pH 8, 50 мМ NaCl, 0.5 мМ ЭДТА. Показано, что ко-кристаллы обладают центрально симметричной триклинной элементарной ячейкой (SG P1), определены параметры ячейки ($a \approx b = 9.3 \pm 0.4$ нм, $c = 10.3 \pm 0.4$ нм, $\alpha = 73^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 60^\circ$, максимальные межплоскостные расстояния $d_1 = 9.8 \pm 0.4$ нм и $d_2 = 8.0 \pm 0.4$ нм). Кристаллы обладают пластинчатой морфологией и состоят из слоев, образованных додекамерами Dps, перемежающихся со слоями цепочек ДНК (рис. 5). Частицы Dps демонстрируют псевдогексагональную упаковку внутри слоя, с углом $\gamma = 60^\circ$ между векторами элементарной ячейки **a** и **b**. Молекулы ДНК, расстояние между которыми составляет 8.0 ± 0.4 нм, упакованы параллельно друг другу в одном направлении вдоль вектора **b** в углублениях между частицами Dps. Каждый слой Dps сдвинут на 3.0 ± 0.4 нм относительно предыдущего вдоль направления **b**. Установлено, что на каждую молекулу Dps в элементарной ячейке приходится 27 ± 3 пары оснований ДНК. Продемонстрировано образование кристаллов комплекса в отсутствии ионов металлов.

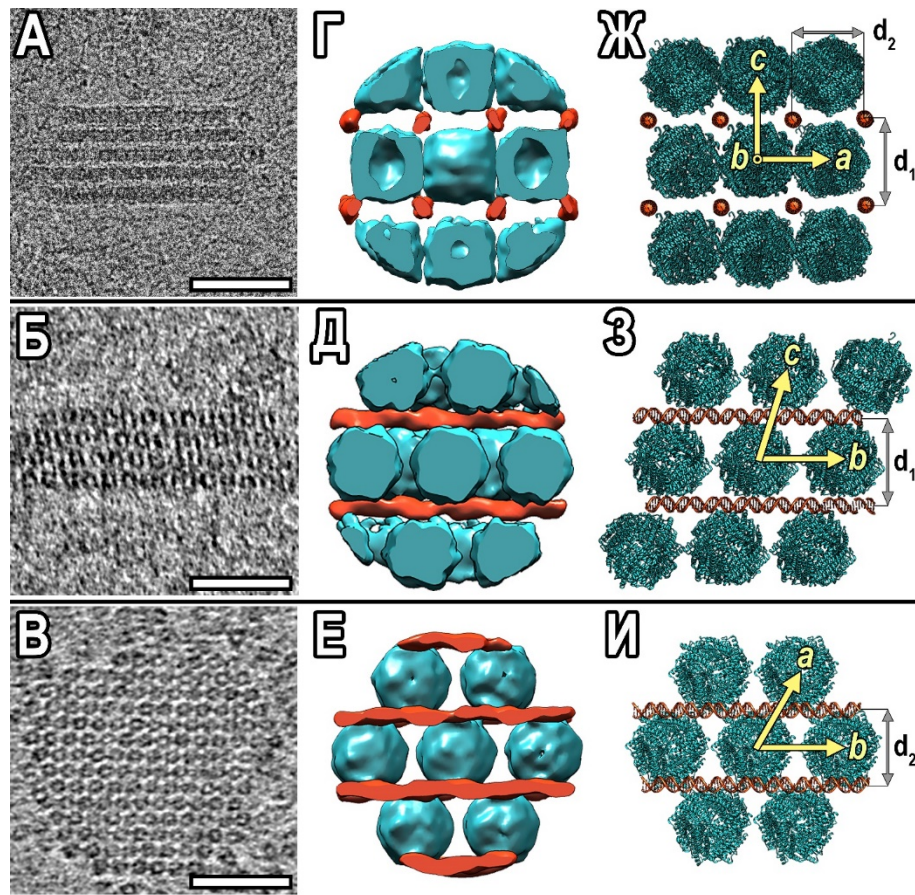


Рисунок 5. Биокристаллы *Dps*-ДНК с триклинной элементарной ячейкой. А–В - томографические срезы ко-кристаллов *Dps*-ДНК в различных ориентациях. Масштабный отрезок 50 нм; Г–Е - трехмерная реконструкция ко-кристаллов в соответствующих ориентациях (пространственное разрешение 13.5 Å). Частицы *Dps* показаны синим цветом, ДНК – красным; Ж–И - известные структуры *Dps* и ДНК, вписанные в полученные трехмерные реконструкции. Желтыми стрелками показаны базисные вектора элементарной ячейки.

В разделе 4.3.2 продемонстрирован полиморфизм кристаллов *Dps*-ДНК, показана зависимость структуры комплекса *Dps*-ДНК от состава и параметров буфера. Установлено, что в буфере 20 мМ Tris-HCl, 20 мМ NaCl, pH 7.5 образуется 2 типа ко-кристаллов (рис. 6). Кристаллы первого типа (рис. 6Б) обладают триклинной элементарной ячейкой, описанной выше.

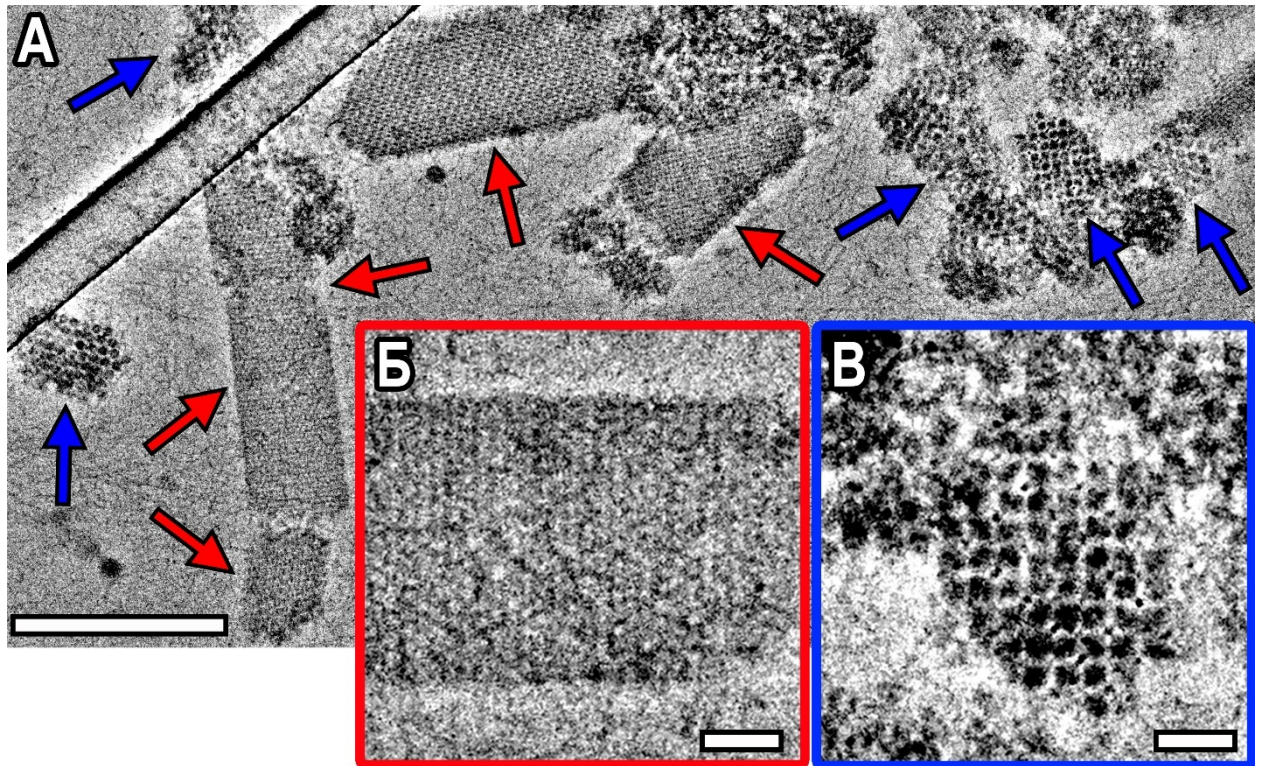


Рисунок 6. Крио-ЭМ изображения биокристаллов *Dps*-ДНК, полученные с использованием фазовой пластины. А – общий вид образца, синие и красные стрелки указывают на ко-кристаллы с различными типами кристаллической структуры. Масштабный отрезок 200 нм; Б, В – примеры ко-кристаллов *Dps*-ДНК с триклинной (Б) и кубической (В) элементарной ячейкой. Масштабный отрезок 20 нм.

По результатам субтомографического усреднения ко-кристаллов второго типа (рис. 6В, рис. 7 Г-Е) определено, что они обладают кубической элементарной ячейкой (рис. 8А) и состоят из додекамеров *Dps* (рис. 8Б), перемежающихся с взаимно перпендикулярными тяжами ДНК (рис. 7). Укладка молекул *Dps* в ко-кристаллах соответствует пространственной группе $Im\bar{3}m$, однако тяжи ДНК понижают симметрию до $Rm\bar{3}m$. Параметры элементарной ячейки ко-кристаллов были определены с помощью крио-ПЭМ изображений и томографических срезов: $a=b=c=13\pm 1$ нм, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, максимальное межплоскостное расстояние 9 ± 1 нм. Пространственное разрешение полученной трехмерной реконструкции составило 13.5 Å.

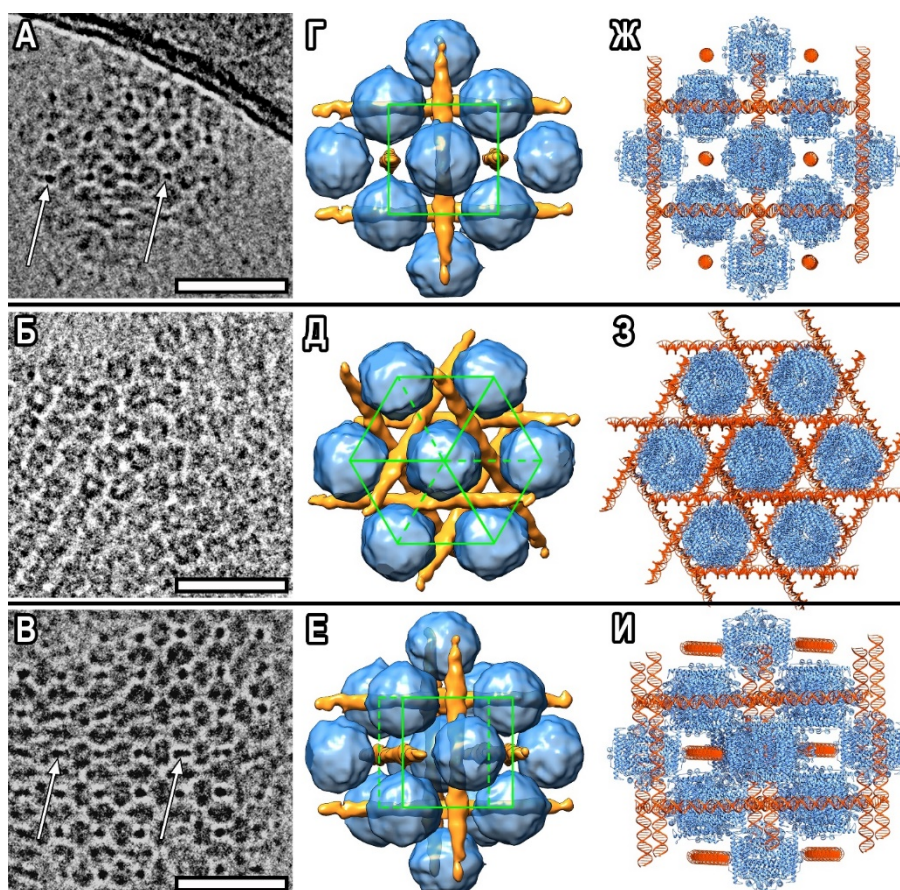


Рисунок 7. Биокристаллы *Dps*-ДНК с кубической элементарной ячейкой. А-В – крио-ПЭМ изображения ко-кристаллов в различных ориентациях (А - $[001]$, Б - $[111]$, В - $[001]$ под наклоном), масштабный отрезок 40 нм. Стрелки указывают на молекулы ДНК. Г-Е – трехмерные реконструкции ко-кристаллов *Dps*-ДНК в соответствующих ориентациях (пространственное разрешение 13.5 Å). Синим показаны молекулы *Dps*, оранжевым – тяжи ДНК, зеленым – элементарная ячейка; Ж-И – известные структуры *Dps* и ДНК, вписанные в полученные трехмерные реконструкции.

Выявлено, что элементарная ячейка содержит две молекулы *Dps* и три ДНК, каждая из молекул *Dps* взаимодействует с 6 тяжами ДНК (рис. 8А). Пространственное разрешение полученной крио-ПЭМ карты позволило визуализировать 4 поры в молекуле *Dps* (рис. 8Б), что привело к пониманию ориентации частиц *Dps* в элементарной ячейке (рис. 7 Ж-И). Вписанные структуры (PDB 1Dps) демонстрируют, что Е-спиральные концы [6] в каждой молекуле *Dps*

расположены по направлению к тяжам ДНК. Установлено, что на каждую молекулу Dps в элементарной ячейке приходится 56 ± 3 пары оснований ДНК. Обнаруженный полиморфизм структур поднимает вопрос о возможном формировании разных типов комплексов на различных стадиях биокристаллизации.

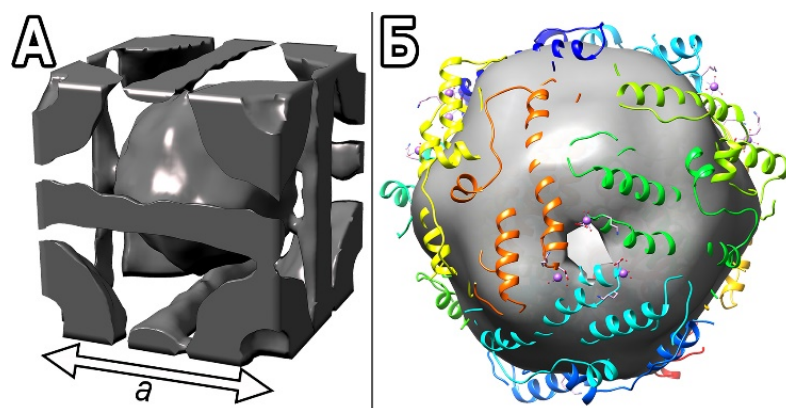


Рисунок 8. *А* – элементарная ячейка полученной кубической кристаллической решетки; *Б* – структура 1DPS [6], вписанная в полученную крио-ПЭМ карту.

В разделе 4.4 проведено исследование образования комплекса Dps-ДНК при смешении препаратов ДНК различной длины и Dps в различных буферах. Установлено, что одиночные комплексы Dps-ДНК формируются в образцах, получаемых при смешении растворов ДНК длиной от 66 до 100 пар оснований и Dps в различных буферах в соотношении 1:1 и 1:2. Структура кристаллов комплекса, формирование которых наблюдалось в большинстве образцов, совпадает с триклинной и кубической структурами кристаллов, представленными в предыдущих разделах. С помощью метода анализа проекций одиночных частиц получена трехмерная структура высокого разрешения свободных частиц Dps, а также трехмерная структура низкого разрешения для комплекса Dps-ДНК.

Проекция, принадлежащие к отобранным классам несвязанных частиц Dps, в дальнейшем были использованы для 3D реконструкции (3D рефайнмента) с учетом тетраэдральной симметрии объекта. В результате получена трехмерная реконструкция (рис. 9) с пространственным разрешением ~ 2.95 Å. Оценка пространственного разрешения реконструкции проведена по критерию $FSC=0.143$.

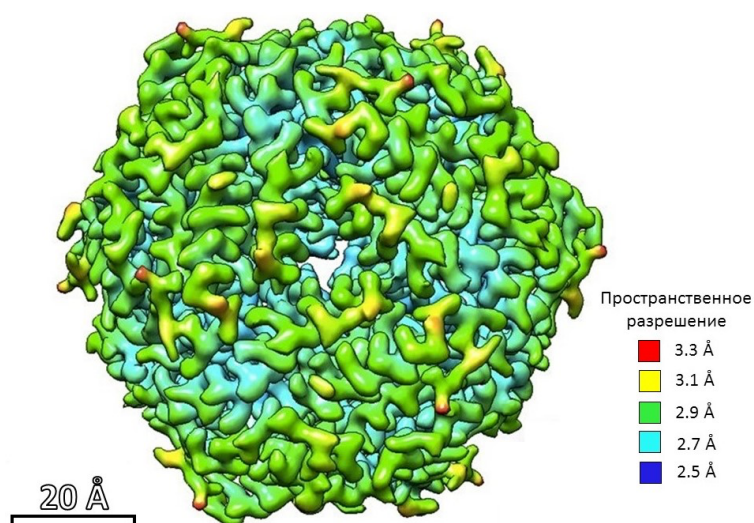


Рисунок 9. Трехмерная реконструкция несвязанных частиц *Dps*, полученная с применением *T*-симметрии.

На рис. 10 представлены двумерные классы изображений, соответствующие плотноупакованным частицам *Dps*. При ближайшем рассмотрении этих классов между центральной частицей *Dps* и частицами, расположенными вокруг нее, видны дополнительные плотности (примеры указаны красным), которые, по всей видимости, соответствуют N-концам, обеспечивающим взаимодействие между молекулами *Dps* в псевдогексагональной упаковке и впервые наблюдаемым в данной работе.

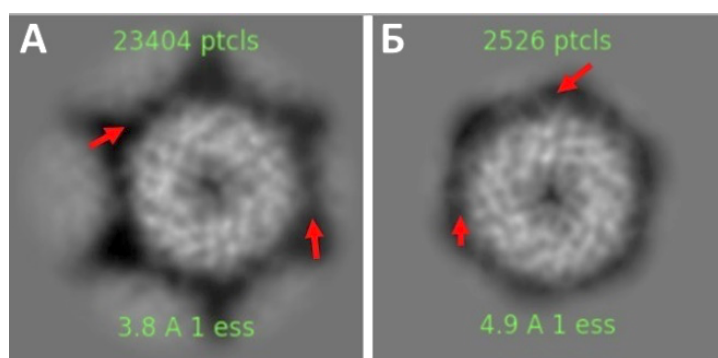


Рисунок 10. 2D классы, соответствующие частицам *Dps* в псевдогексагональной упаковке с наблюдаемыми N-концами.

Результаты, представленные в Главе 4, опубликованы в работах [A1, A2] и тезисах докладов [A8-A16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные **результаты** работы могут быть сформулированы следующим образом:

1. Впервые продемонстрирован полиморфизм кристаллов комплекса Dps-ДНК, полученных *in vitro*. Проведена трехмерная реконструкция и субтомографическое усреднение для исследуемых нанокристаллов. Показано формирование кристаллов двух различных типов с размерами в диапазоне 40 нм - 300 нм.
2. Обнаружена зависимость структуры комплекса Dps-ДНК от условий его формирования, то есть от состава буфера и pH. Впервые показано, что в буфере 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7,5 образуется 2 типа со-кристаллов с различной морфологией.
3. Определено, что кристаллы комплекса первого типа обладают центрально симметричной триклинной элементарной ячейкой (SG P1) с параметрами $a \approx b = 9.3 \pm 0.4$ нм, $c = 10.3 \pm 0.4$ нм, $\alpha = 73^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 60^\circ$. Кристаллы обладают пластинчатой морфологией и состоят из слоев, образованных додекамерами Dps, перемежающихся со слоями тяжелой ДНК. Частицы Dps демонстрируют псевдогексагональную упаковку внутри слоя, с углом $\gamma = 60^\circ$ между векторами элементарной ячейки **a** и **b**. Молекулы ДНК, расстояние между которыми составляет 8.0 ± 0.4 нм, упакованы параллельно друг другу в одном направлении вдоль вектора **b** между частицами Dps. Каждый слой Dps сдвинут на 3.0 ± 0.4 нм относительно предыдущего вдоль направления **b**. Установлено, что на каждую молекулу Dps в элементарной ячейке приходится 27 ± 3 пары оснований ДНК. Соответствующая карта плотности рассеивающего потенциала с пространственным разрешением 13.5 Å размещена в электронно-микроскопической базе данных под номером EMD-4615.
4. Определено, что кристаллы второго типа состоят из додекамеров Dps, перемежающихся с взаимно перпендикулярными тяжами ДНК, и обладают

кубической элементарной ячейкой ($Pm\bar{3}m$) с параметрами $a=b=c=13\pm 1$ нм, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$. Выявлено, что элементарная ячейка содержит две молекулы Dps и три ДНК. Каждая из молекул Dps взаимодействует с 6 тяжами ДНК. Наблюдаемые поры центральной молекулы Dps в элементарной ячейке ориентированы к порам четырех молекул Dps в вершинах ячейки, которые повернуты на 90° по отношению к ориентации $[001]$ центральной молекулы. Установлено, что на каждую молекулу Dps в элементарной ячейке приходится 56 ± 3 пары оснований ДНК. Полученная карта плотности рассеивающего потенциала с пространственным разрешением 13.5 \AA размещена в базу данных электронной микроскопии под номером EMD-10286.

5. Проведено сравнение бактериальных клеток до и после стрессового воздействия. Показано, что предварительное стрессовое воздействие на бактериальную клетку приводит к формированию биокристаллов. Впервые визуализировано пространственное положение биокристаллов в клетках *Escherichia coli*.
6. С помощью анализа структуры индивидуальных частиц по данным крио-ПЭМ впервые визуализированы N-концевые фрагменты додекамеров Dps на двумерных классах изображений, а также взаимодействие Dps-ДНК. С разрешением 2.95 \AA получена структура отдельных додекамеров белка Dps с разупорядоченными N-концевыми фрагментами.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wolf, S.G. DNA protection by stress-induced biocrystallization / S.G. Wolf, D. Frenkiel, T. Arad, S.E. Finkel, R. Kolter, A. Minsky // *Nature* – 1999. – V. 400 – № 6739 – P.83–85.
2. Frenkiel-Krispin, D. Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria / D. Frenkiel-Krispin, I. Ben-Avraham, J. Englander, E. Shimoni, S.G. Wolf, A. Minsky // *Molecular Microbiology* – 2004. – V. 51 – № 2 – P.395–405.
3. Almiron, M. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. / M. Almiron, A.J. Link, D. Furlong, R. Kolter // *Genes & Development* – 1992. – V. 6 – № 12b – P.2646–2654.
4. Nair, S. Dps Protects Cells against Multiple Stresses during Stationary Phase / S. Nair, S.E. Finkel // *Journal of Bacteriology* – 2004. – V. 186 – № 13 – P.4192–4198.
5. Ren, B. The Multi-layered Structure of Dps with a Novel Di-nuclear Ferroxidase Center / B. Ren, G. Tibbelin, T. Kajino, O. Asami, R. Ladenstein // *Journal of Molecular Biology* – 2003. – V. 329 – № 3 – P.467–477.
6. Grant, R.A. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA / R.A. Grant, D.J. Filman, S.E. Finkel, R. Kolter, J.M. Hogle // *Nature Structural Biology* – 1998. – V. 5 – № 4 – P.294–303.
7. Calhoun, L.N. Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review / L.N. Calhoun, Y.M. Kwon // *Journal of Applied Microbiology* – 2011. – V. 110 – № 2 – P.375–386.
8. Minsky, A. Stress, order and survival / A. Minsky, E. Shimoni, D. Frenkiel-Krispin // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* – 2002. – V. 3 – № 1 – P.50–60.
9. Yip, K.M. Breaking the next Cryo-EM resolution barrier – Atomic resolution determination of proteins ! / K.M. Yip, N. Fischer, E. Paknia, A. Chari, H. Stark // *bioRxiv preprint* – 2020.
10. Tegunov, D. Multi-particle cryo-EM refinement with M visualizes ribosome-antibiotic complex at 3.7 Å inside cells / D. Tegunov, L. Xue, C. Dienemann, P. Cramer, J. Mahamid // *bioRxiv preprint* – 2020.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- A1. **Kamyshinsky, R.** Polymorphic Protective Dps–DNA Co-Crystals by Cryo Electron Tomography and Small Angle X-Ray Scattering / R. Kamyshinsky, Y. Chesnokov, L. Dadinova, A. Mozhaev, I. Orlov, M. Petoukhov, A. Orekhov, E. Shtykova, A. Vasiliev // *Biomolecules* – 2020. – V.10 – №1 – 39.
- A2. Dadinova, L. A. Protective Dps–DNA co-crystallization in stressed cells: an in vitro structural study by small-angle X-ray scattering and cryo-electron tomography / L. A. Dadinova, Y. M. Chesnokov, **R. A. Kamyshinsky**, I. A. Orlov, M. V. Petoukhov, A. A. Mozhaev, E. Yu. Soshinskaya, V. N. Lazarev, V. A. Manuvera, A. S. Orekhov, A. L. Vasiliev, E. V. Shtykova // *FEBS Letters* – 2019. – V.593 – №12 – P.1360-1371.
- A3. **Камышинский, Р.А.** Криогенная электронная томография в исследованиях клеточных систем / Р.А. Камышинский, Ю.М. Чесноков, А.С. Орехов // *Кристаллография* – 2020. – Т.65 – №5 – С.774-779.
- A4. Emelyanov, A. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles from cerebrospinal fluid / A. Emelyanov, T. Shtam, **R. Kamyshinsky**, L. Garaeva, N. Verlov, I. Miliukhina, A. Kudrevatykh, G. Gavrilov, Y. Zabrodskaya, S. Pchelina, A. Konevega // *Plos one* – 2020. – V.15 – №1 – e0227949.
- A5. Bogdanova, O. I. Effect of exfoliating agent on rheological behavior of β -chitin fibrils in aqueous suspensions and on mechanical properties of poly (acrylic acid)/ β -chitin composites / O. I. Bogdanova, A.P. Istomina, N.A. Glushkova, S.I. Belousov, N.M. Kuznetsov, D.K. Polyakov, S.N. Malakhov, S.V. Krashenninikov, A.V. Bakirov, **R.A. Kamyshinsky**, A.L. Vasiliev, D.R. Streltsov, S.N. Chvalun // *International journal of biological macromolecules* – 2019. – V.139. – P.161-169.
- A6. **Kamyshinsky, R.** Composite materials based on Ag nanoparticles in situ synthesised on the vaterite porous matrices / R. Kamyshinsky, I. Marchenko, B. Parakhonskiy, A. Yashchenok, Y. Chesnokov, A. Mikhutkin, D. Gorin, A. Vasiliev, T. Bukreeva // *Nanotechnology* – 2019. – V.30 – №3 – 035603.

- A7. Kuznetsov, N. M. Unique rheological behavior of detonation nanodiamond hydrosols: The nature of sol-gel transition / N. M. Kuznetsov, S. I. Belousov, A. V. Bakirov, S. N. Chvalun, **R. A. Kamyshinsky**, A. A. Mikhutkin, A. L. Vasiliev, P. M. Tolstoy, A. S. Mazur, E. D. Eidelman, E. B. Yudina, A. Ya. Vul // Carbon – 2020. – V.161. – P.486-494.

СПИСОК ТЕЗИСОВ КОНФЕРЕНЦИЙ

- A8. **Kamyshinsky, R.** Abstract OR-22: In vitro Cryo Electron Tomography study of protective Dps-DNA co-crystallization / R. Kamyshinsky, Y. Chesnokov, L. Dadinova, A. Mozhaev, A. Orekhov, E. Shtykova, A. Vasiliev // International Journal of Biomedicine – 2019. – V. 9 – Suppl_1 – P.S15.
- A9. Dadinova, L.A. Investigations of Dps/DNA crystallization conditions and the structure of biocrystals according to SAXS and cryo-electron microscopy data / L.A. Dadinova, Yu. M. Chesnokov, **R.A. Kamyshinsky**, A.S. Orekhov, M.V. Petoukhov, A.A. Mozhaev, E.Yu. Soshinskaya, A.L. Vasiliev, E.V. Shtykova // FEBS Open Bio – 2019. – V. 9 (1). – P.313.
- A10. **Камышинский, Р.А.** Определение структуры комплекса Dps-ДНК методами криоэлектронной томографии / Р.А Камышинский., Ю.М. Чесноков, Л.А. Дадинова, А.А. Можаяев, М.В. Петухов, А.С. Орехов, Э.В. Штыкова, А.Л. Васильев // XXVIII Российская конференция по электронной микроскопии – Черногловка, 2020. – Т. 2. – С. 120.
- A11. **Камышинский, Р.А.** Исследования процессов формирования биокристаллов Dps-ДНК / Р.А. Камышинский, Ю.М. Чесноков, Л.А. Дадинова, А.А. Можаяев, М.В. Петухов, А.С. Орехов, Э.В. Штыкова, А.Л. Васильев // Материалы XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. Тезисы докладов Молодежной конференции – Гатчина, 2020. – С. 97-98.
- A12. Чесноков, Ю.М. Оптимизация условий подготовки ультратонких клеточных срезов для криогенной электронной томографии методом фокусированного ионного пучка / Ю.М. Чесноков, **Р.А. Камышинский**, А.С. Орехов //

- Материалы XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. Тезисы докладов Молодежной конференции – Гатчина, 2020. – С. 228-229.
- A13. Дадинова, Л.А. Структурные аспекты механизма защиты бактериального генома по данным малоуглового рентгеновского рассеяния и криоэлектронной микроскопии / Л.А. Дадинова, А.А. Можаяев, **Р.А. Камышинский**, Ю.М. Чесноков, И.А. Орлов, Е.Ю. Сошинская, М.В. Петухов, А.С. Орехов, А.Л. Васильев, Э.В. Штыкова // XV международная научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2020» – Севастополь, 2020. – С. 29.
- A14. **Камышинский, Р.А.** Исследование процессов биокристаллизации для защиты генетического материала с помощью криоэлектронной томографии / Р.А. Камышинский, Ю.М. Чесноков, А.С. Орехов, А.Л. Васильев // Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии – Гатчина, 2019. – С. 144-145.
- A15. **Камышинский, Р.А.** Полиморфизм структур биокристаллов Dps-ДНК / Р.А. Камышинский, Ю.М. Чесноков, Д.А. Дадинова, А.А. Можаяев, И.А. Орлов, М.В. Петухов, А.С. Орехов, Э.В. Штыкова, А.Л. Васильев // Сборник аннотаций XVI Курчатовской междисциплинарной молодежной научной школы – Москва, 2019. – С.89.
- A16. **Камышинский, Р.А.** Исследование процессов биокристаллизации для защиты генетического материала с помощью криоэлектронной томографии / Р.А. Камышинский, Ю.М. Чесноков, А.С. Орехов, А.Л. Васильев // Материалы 61-й Всероссийской научной конференции МФТИ – Москва, 2018. – С. 33.